

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 20 ____ г.

Бакалаврская работа

Тема: Биодegradация и применение гранул на основе смесей из П(ЗГБ) и природных материалов.

06.03.01 – Биология

Руководитель _____
подпись, дата

доцент, к. т. н.
должность, учёная степень

С.В. Барановский
инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

А.И. Волчек
инициалы, фамилия

Красноярск 2020

Оглавление

Введение	3
1. Обзор литературы	5
1.1 Биохимия сельского хозяйства	5
1.2 Полигидроксиалканоаты, их свойство и применение	9
1.3. Свойство полигидроксиалканоатов	9
1.4 Процессы биodeградации полигидроксиалканоатов	11
1.5 Гербицидные препараты и формы их применения	14
2. Материалы и методы	15
2.1 Процесс биосинтеза бактерий <i>Cupriavidus eutrophus</i> B10646	15
2.1.1 Процесс приготовления питательных растворов и их стерилизация.	15
2.1.2 Получение инокулята из музейной культуры	17
2.1.3 Получение инокулята в ферментёре-инокуляторе	18
2.1.4 Двустадийная ферментация в производственном ферментёре.	18
2.1.5 Концентрирование бактериальной культуры	19
2.1.6 Центрифугирование и лиофильная сушка сгущенной культуры	19
2.2 Природные наполнители	19
2.3 Получение гранул из композитов.	20
2.4 Исследование биodeградации гранул с различным наполнителем	22
2.5 Изготовление долговременных формы гербицидных препаратов с опилками	22
2.6 Экспериментальные формы препарата гербицидного действия в лабораторных посевах сорных растений	22
2.7 Регрессионный анализ	23
2.3 Объект исследования	28
3. Результаты	29
3.1 Дeградация гранул в почве	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Математическое моделирование	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Эффективность долговременных форм гербицидных препаратов в лабораторных посевах зерновых культур зараженные сорняками.	Ошибка! Закладка не определена.
Выводы	29

Введение

Одними из самых распространённых видов отходов производственного характера являются нефтехимические пластики, которые имеют долгий путь разложения. Они образуют целые острова в море и горы на суше. Путем решения данной проблемы является замена нефтехимического пластика на биополимер. Он, в отличие от синтетических пластиков, имеет много положительных качеств, среди которых высокий уровень биodeградации и полная биосовместимость.

Биополимером является внутриклеточное запасующее вещество бактерии, которое синтезируется в стрессовых условиях, таких как избыточное содержание углерода и недостаточное содержание различных питательных элементов, таких как азот и фосфор. Также он очень быстро разлагается в природных как аэробных так и анаэробных условиях так как подвержен воздействию бактерий.

Самый распространённый биополимер это полигидроксиалканоаты (ПГА) синтезируемы бактериями *Cupriavidus Eutrophus*, из которого производят различные матриксы, пленки и гранулы для разных медицинских и сельскохозяйственных нужд.

В сельском хозяйстве возникли такие проблемы, как деградация и истощение почвы, неконтролируемо используемое минеральных удобрений. После внесения различных удобрений остается в почве небольшая часть, остальная доля веществ быстро смывается в водоёмы тем самым нанося непоправимый ущерб природе.

Одним из путей решения этой проблемы является использования новых сельскохозяйственных препаратов на основе биополимера, который будет биоразлагаться и давать экстраполированный выход активных веществ, что может существенно снизить как стоимость вносимых препаратов, так и их эффективность.

Цель работы: Исследовать биodeградацию гранул из различных композитов на основе П(ЗГБ), получить гербицидные препараты и определить перспективу их использования в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками.

Задачи:

1. Отработать методику изготовления и получить образцы гранул из композитных материалов на основе П(ЗГБ) и природных наполнителей.
2. Исследовать влияние природных наполнителей на скорость биodeградации полученных образцов гранул и получить математическую модель исследуемого процесса.
3. Изготовить образцы долговременных форм гербицидных препаратов на основе П(ЗГБ) и древесных опилок и исследовать возможность применения полученных гербицидных препаратов в сельском хозяйстве для борьбы с сорняками

1. Обзор литературы

1.1 Биохимия сельского хозяйства

Стремительный рост населения земли у вынуждает потребление продуктов питания, что вынуждает искать более эффективные технологии ведения сельского хозяйства. Это приводит к интенсивному использованию различных химических веществ, которые используют для эффективной борьбы с насекомыми – вредителями, сорняками и возбудителями заболеваний аграрных видов. [1] Статистика показывает, что в мире теряется около 37% урожая из-за различных вредителей в том числе 13% из-за насекомых, 12% от болезней и столько же от сорняков [2]. Проблемой применения большого количества химических удобрений является их способность накопления в экосистеме, это приводит к нарушениям трофических цепей, уменьшения биоты, и нарушения баланса в агроценозах [3,4]. Из-за этого эффективность удобрений очень мала, большая их часть оседает в биологических объектах, загрязняя природу и уменьшая биоразнообразие. А при все большей интенсификации сельского хозяйства расходы химических удобрений и пестицидов будут только расти [5,6].

Согласно терминологии, принятой конвенцией ООН, пестицидами считаются вещества различного происхождения, применяемые для предотвращения заболеваний и контаминации паразитами, регулирования численности вредителей, ингибиторов роста у нежелательных растений, а также все возможные регуляторы и стимуляторы роста. [7]

В 2016 году во всем мире было потрачено около 60 миллиардов долларов на закупку 3 миллионов тонн различных химических удобрений из них 40 % это гербициды 17% это инсектициды и 10% фунгициды [8,9]. Пестициды стоят на 8 месте по опасности загрязнения природных экосистем,

что является очень высоким показателем и вызывает обеспокоенность экологов.

Точное количество применяемого пестицида подсчитать очень сложно, примерно от 2 до почти 4 миллионов тонн. Большая часть продаваемых пестицидов приходится на Латинскую Америку и Азию. В Европе используют 45% пестицидов в США 25% [10].

Производство пестицидов заключается в их искусственном синтезе и дальнейшем внесении в почву для регуляции сорняков и различных вредителей посевов. Этот класс удобрений максимально пагубно сказывается на окружающей среде, что приводит к сильнейшим нарушениям водных и наземных экосистем. В глобальном масштабе механизм влияния на биоценозы пока еще изучен недостаточно глубоко. Кроме того, в интенсивном сельском хозяйстве распространена практика использования нескольких пестицидов сразу, что может приводить к их взаимному ослабляющему действию. Данное утверждение можно проиллюстрировать примером воздействия триазиновых удобрений, которые могут в несколько раз усилить токсичность органофосфорных инсектицидов или, наоборот, сильно снижать токсичность фунгицида прохлораза. Некоторые такие соединения очень негативно влияют на организм человека [11]. Они могут вызывать такие заболевания как рак, диабет, невротические расстройства и нарушение репродуктивной функции и, как следствие, врожденные пороки [12]. Для детей пестициды представляют опасность даже в микродозах, содержащихся в продуктах питания. Поэтому очень важно искать другие пути и эффективные средства защиты сельскохозяйственных растений, а также снизить негативное влияние на человека [13].

Также одна из проблем связана с продуктами распада пестицидов. Они могут быть токсичнее изначального пестицида. Примером может служить гербицид глифосат, а основной продукт, образующий при его деградации, аминотетилфосфоновая кислота очень часто встречается в пресноводных

водоемах. В клетках растений в отличие от животных присутствует шикиматный путь ароматических аминокислот, который и блокирует глифосат, но в небольших количествах вызывает апоптоз клеток животных, а присутствие аминотетилфосфоновой кислоты сильно увеличивает токсичное воздействие [14].

Все пестициды можно разделить на несколько классов, которые применяются в таких сферах жизни человека как сельское хозяйство, медицина, промышленность, добыча полезных ископаемых и в других различных сферах. На данный момент зарегистрировано более 1300 различных продуктов из 900 химических соединений. Большую часть около 31% занимают гербициды, следующие место, занимают инсектициды примерно 21%, фунгициды 17%, и остальные биоциды около 20%. На данный момент примерно 610 продуктов, в большинстве своем хлорсодержащие инсектициды, запрещены к использованию, потому что их признали высоко токсичными или мало эффективными, а также из-за возникновения резистентности у организмов мишеней [15].

На данный момент идентифицировано более 227 сорняков, которые способны уничтожить около 90% урожая. Пестициды применяют в виде порошков, аэрозолей, эмульсий, дустов и гранул. На скорость деградации пестицидов влияют такие факторы, как органический и минеральный состав почвы, влажность, температура, количество кислорода. Сама деградация происходит как с помощью окисления, адсорбции, гидролиза или каталитического разложения, так и под воздействиями микроорганизмов, обитающих в почве. Пестициды имеют сильное токсическое воздействие на все живые организмы. Применяют пестициды только когда популяция достигает определенной плотности [16].

Обычно пестициды используют в намного больших количествах, чем это необходимо для уничтожения вредителей. Но самая сильная опасность кроется в большом периоде распада пестицида, что позволяет ему оставаться

в почве месяцами, а в некоторых случаях даже годами. Также пестициды имеет свойство распространяться далеко за пределы площадей, которые ими обработали. Больше половины веществ попадает в атмосферу при распылении, или переносится с листвы в почву дождем и ветром или с различными остатками неубранных растений. Если вносить пестициды в почву, то это приводит к высокому остаточному содержанию. Статистика распыления пестицидов из самолета показывает, что земли достигает от 25 до 40 % вещества остальное рассеивается [16].

Применение гербицидов происходит в высоких дозах, но со временем их эффективность снижается, что вызывает необходимость в повторной обработке посевных площадей. Это происходит из-за различных причин, таких, как химическая, биологическая или фото деградация, а также возможно выщелачивание или вымывание пестицидов из почвы.

Остатки соединений пестицидов находят в различных географических регионах даже тех, которые сильно отдалены от сельскохозяйственных зон. Так же остатки пестицидов найдены в трофических цепях и их концентрация увеличивается от звена к звену. Люди не являются исключением. В исследованиях было выявлено, что содержание пестицидов в выделениях и тканях человека не зависит от района проживания. По доступной статистике за 80-е и 90-е годы 20-го века причиной 1,0 – 1,5 млн. случаев серьезной интоксикации людей являлись остаточные вещества деградации пестицидов. Данные ООН показывают, что 40 000 людей погибает в год от отравления этими соединениями [17].

Применение пестицидов приводит к потере биомассы и уменьшению разнообразия видов. Например, фунгициды нарушают баланс микробиоты, которая играет основную роль в утилизации органических веществ в почве. Инсектициды токсичны для большинства беспозвоночных птиц и мелких млекопитающих, что может вызывать гибель и нарушение трофических цепей биоценозов данного региона. То есть, основную опасность для

экологии среды представляет высокая токсичность пестицидов. Это может приводить к опаданию завязей плодов, ограничению роста растений и плодоношения, формированию групповой устойчивости, непредсказуемым накоплениям остатков в земле, уничтожению полезной флоры и фауны. Но самая серьезная проблема заключается в том, что у вредителей и сорняков развивается устойчивость ко многим видам пестицидов. Известно большое количество видов, которые без сверхкрупных доз не реагируют на применяемые препараты [18].

1.2 Полигидроксиалканоаты, их свойство и применение

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются полимерами природного происхождения. Данные полимеры синтезируют бактерии как запасующее вещество в неблагоприятных условиях внешней среды. Впервые ПГА были обнаружены в 1888 году голландским микробиологом Мартином Бейеринком. До 1973 года биополимер вызывал интерес для изучения только как внутриклеточное соединение, которое играет определенную роль в физиологических процессах жизнедеятельности. В 1976 году в Британии впервые развернули коммерческое производство поли-3-гидроксибутирата [19]. Интерес к промышленному производству начал возникать не только при появлении возможности синтезировать полимер из возобновляемого сырья, обладающего свойством термопластичности, напоминающем пропилен, а также биосовместимости и биоразлагаемости. В дальнейшем исследовали различные штаммы бактерий, способных синтезировать биополимер. К настоящему времени описано более 150 видов ПГА с уникальными свойствами [20].

1.3. Свойство полигидроксиалканоатов

ПГА являются хорошей основой для создания изделий с различными физико-химическими свойствами. Это обусловлено строением их структуры, то есть расположением боковой группы и расстояния эфирных групп по

отношению к основной цепи в молекуле. Отличительные свойства этих полимеров заключается в их термопластичности, пьезоэлектрическом эффекте, оптической активности, антиоксидантных свойствах, гидрофильности. Но самыми основными преимуществами ПГА являются их биосовместимость и биоразрушаемость [21].

У ПГА температура кипения выше температуры плавления. Это определяет такие термомеханические свойства как кристалличность, стеклообразность, текучесть и вязкость. Способность ПГА кристаллизоваться в нативном состоянии является основным параметром термомеханических свойств. То есть полимер кристаллизуется не во всем объёме полимера, что придает полукристаллическую структуру материалу. В зависимости от вида полимера степень кристалличности может достигать 10-80%. Данное свойство не является строгим, его можно менять, изменяя условия культивирования, штамм-продуцента, условия питания [22].

Одно из классификации полимера зависит от набора мономеров. Если присутствует только один тип полимера, то это гомополимер. Если они составлены из разных мономеров, то они называются сополимерами. Очень большой набор характеристик зависит от содержания мономеров в полимере [23].

Одним из самых распространённых гомополимеров является поли-3-гидроксibuтерат. Его можно охарактеризовать как изотактический полиэфир с регулярным повторением единиц ($C_4H_6O_2$). Его отличие перед синтетическими полиэфирами заключается в стереорегулярной оптической активности, который образует спирали в растворе и кристаллизуется в сферолиты в гидрофобное бесцветное вещество [24].

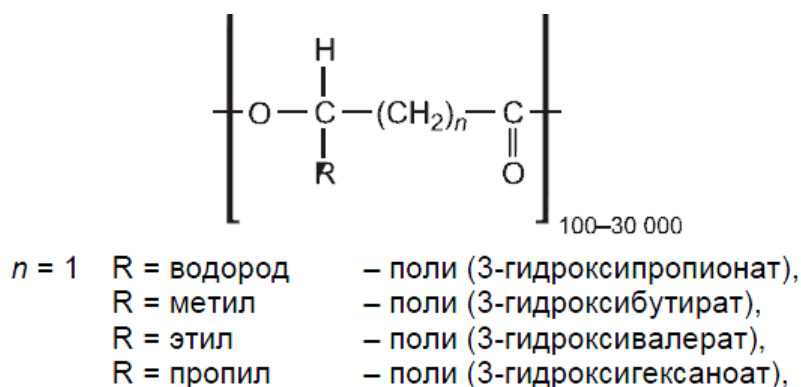


Рисунок 1. Структура полимера

Сополимеры ПГА считаются более многообещающими по причине возможности большого выбора нужных физико-химических свойств в зависимости от химического состава. Главным преимуществом являются более низкие температуры плавления, что в свою очередь не влияет на температуру деградации. В качестве примера можно привести 3-гидроксibuтирата и 3-гидроксивалерата, у которого температура плавления ниже чем у нефтехимических полимеров. Вторым важным свойством является степень кристалличности, которая у сополимеров гораздо ниже, чем у гомогенного поли-3-гидроксibuтирата [25].

1.4 Процессы биodeградации полигидроксиканоатов

Одним из самых основных преимуществ биополимера является его свойство деградировать в почве. При биodeградации происходит распад ПГА на безвредные для живых организмов продукты, в них входит диоксид углерода и вода при условиях анаэробной деградации и метан с водой при анаэробных. Распад происходит под действием ПГА-деградирующих микроорганизмов, которые имеют ПГА-деполимеразы. Еще один способ деградации — это разрыв С-цепи перпендикулярно ламеллярному слою до ламеллярного центра [26,27].

Степень деструкции смотрят по уменьшению молекулярной массы, степени кристалличности полимера, весу и прочности полимерных изделий. Скорость деградации можно увеличить если использовать сополимер,

добавить еще один вид полимера или пластификатор, облучить полимер ультрафиолетом. Микроорганизмы и грибы, которые являются основными организмами способными разрушать ПГА, были выявлены во всех без исключения экосистемах [28].

Физико-химические свойства полимера изменяются в морских условиях через 180 дней изменение температуры плавления сополимера, молекулярного веса, полидисперсности и степени кристалличности. Поверхность ПГА при биodeградации температуры эродировала, а кристаллизация линейно снижалась коррелирующую с увеличением времени биodeградации [29].

При некоторых исследованиях было выявлено, что у всех видов сополимера степень кристалличности и разрушения молекулярно-массовых характеристик увеличивается с возрастанием полидисперсности, что свидетельствует о разрушении С-цепей в полимере и увеличении количества фрагментов, имеющих разную степень полимеризации [30].

Влияние температуры на процесс разрушения колеблется в диапазоне 16 – 30 градусов, при этом скорость деградации растет в зависимости от роста температуры. Выше 35 градусов процесс замедлялся, а оптимальная температура была выявлена от 21 до 28 градусов. Такая температура была определена оптимальной для роста бактерий [31].

Степень кристалличности при этом у ПЗГБ не изменялась после нахождения в почве 35 дней. Это может свидетельствовать о том, что кристаллическая и аморфная фазы разрушались одновременно, ПЗГВ возрастал до 60%, что свидетельствует о более интенсивном разрушении аморфной фазы.

Микробная составляющая почвы имеет большое значение для гидролитических и деградационных процессов. Большинство микроорганизмов участвуют в утилизации ПГА [32]. Интенсивность

процесса разрушения ПГА зависит от таких факторов как климатические условия, РН, влажность, концентрация питательных веществ, температуры и активности микроорганизмов.

На деградацию ПГА влияет не только физико-химические свойства полимеров, но и геометрия структуры поверхности, что способствует более плотному прикреплению и дальнейшему развитию на нем микроорганизмов, поэтому гидролиз развивается снаружи внутрь изделия из ПГА [33].

Полученные данные показали зависимость того, что все известные типы ПГА разрушаются с одинаковой скоростью. И этот период полураспада составляет около 42 дней при расположении образцов на поверхности почвы и около 28 суток для образцов, которые находились посредственно в почве на глубине около 20 сантиметров. Так же было выявлено, что чем глубже находился образец, тем быстрее проходит процесс биodeградации [34,35].

При изучении данных литературы стало ясно, что на деградацию влияет очень большое количество параметров, таких как разные виды почв, их химический состав, количество микроорганизмов, влажность, температура, а также состав и вид полимера.

Было выяснено, что пленочные образцы разрушались больше нежели прессованные объёмные формы. Зафиксировано более быстрое разрушение образцов гомополимера ПЗГБ, чем сополимера, что связано с особенностями структуры и свойствами поверхности образцов [36].

1.5 Гербицидные препараты и формы их применения

Гербициды — это химические вещества, уничтожающие сорные или ненужные растения. Они занимают очень большую нишу от 40 до 50 % всех выпускаемых пестицидов. Это связано с очень высоким вредом, причиняемым сорняками. Применение данных препаратов значительно повышает эффективность сельского хозяйства [37]. Действие гербицида можно разделить на 2 типа: сплошное и селективное. Сплошное действие распространяется на все виды растений, а избирательное действие - только на определённые виды. Естественным последствием этого является насыщение почвы химическими соединениями, в результате чего наносится вред окружающей среде, возникает резистентность у сорняков, сильно нарушаются агросистемы, угнетаются чувствительные виды в севообороте, и ставится плодородие почв в уязвимое положение. Гербициды метаболизируются многими видами бактерий, но эти метаболиты гораздо более токсичны самих применяемых препаратов. Одним из способов повысить эффективность сельского хозяйства — это уменьшить количество используемых сельскохозяйственных удобрений, и увеличить пролонгированный выход препаратов в почву [38].

В настоящее время широкое использование ПГА характеризуется его высокой стоимостью производства. Для этого можно использовать различные природные препараты. И образовывать смеси, состоящие из трех компонентов, таких как полимер, материал наполнитель и гербицид .

На данный момент применяются 3D формы, пленки и микрогранулы. Геометрия формы может существенно оказывать влияние на динамику разрушения формы смеси полимера, что дает возможность регулировать интенсивность выхода нужного вещества в почву.

2. Материалы и методы

2.1 Процесс биосинтеза бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646

Получение биополимера в нашей лаборатории производится по технологии культивирования бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в ферментере, используя лимитирование азота.

Весь сложный технологический цикл синтеза полигидроксиалканоатов складывается из следующих этапов.

Первый этап — это приготовление технологических сред и растворов, дальнейшая их стерилизация, таких как мочевины, глюкоза, микроэлементы, буфер.

Второй этап — это получение инокулята из музейной культуры, и дальнейшее масштабирование процесса для использования в ферментёре.

Третий этап - это двухстадийная ферментация в большом ферментере-инокуляторе на 30, а затем на 150 литров.

Четвертый этап – концентрация бактериальной культуры и дальнейшее центрифугирование для получения более густой биомассы.

Пятый этап - это лиофильная сушка, а так же очистка полимера.

Шестой этап - это анализ, определение и дальнейшее создание различных 3D форм.

2.1.1 Процесс приготовления питательных растворов и их стерилизация.

При работе с культурой очень важно предотвратить контаминацию культуры. Если произойдет заражение культуры, то она может погибнуть или процесс не даст нужного результата, поэтому вся используемая посуда должна быть простерилизована в автоклаве паром при давлении 0,1013 Мпа

и температуре свыше 100 градусов. После этого стерильность сохраняется около 5 часов после извлечения из автоклава.

Процесс приготовления маточных растворов начинается с растворения необходимых навесок в дистиллированной воде при комнатной температуре.

Основу минеральной среды составляет смесь четырех растворов. Размер каждого строго берется в соответствие с необходимой программой исследования.

Раствор	Компонент	Концентрация, г/л
А	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	9,0
	KH_2PO_4	1,5
Б	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
В	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \times \text{H}_2\text{O}$ Кипятить до полного растворения. Испарившуюся воду необходимо по окончанию растворения дополнить.	5,0
Г	H_3BO_3	0,228
	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,030
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,008
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0,008
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,176
	$\text{NaMoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0,050
	NiCl_2	0,008

Воду для разведения использовать только дистиллированную и не допускать плохого растворения.

Для получения дистиллированной воды, которая используется на всем протяжении ферментации применяют аквадистиллятор электрический производительностью 25 л/ч.

Стерилизация данных растворов происходит при температуре плюс 120°C, давлении 0,11 МПа в течение 45 минут.

Раствор глюкозы ($C_6H_{12}O_6$) следует разводить 500 г/л. Стерилизацию производят прокачивая раствор перестатическим насосом через предфильтр. Также применяют стерилизацию паром при 115 градусах.

Карбомид (CH_4N_2O) в ферментационном процессе используется как источник азота. Раствор мочевины готовят с концентрацией 60 г/л. Стерилизация происходит перекачкой раствора перестатическим насосом через стерилизующий фильтр или путем автоклавирования при температуре 125 градусов.

При образовании пены во время ферментации используют пламегаситель роль которого выполняет подсолнечное масло. Пеногаситель должен быть стерилен. Для этого подсолнечное масло в объёме 50 мл залить в колбу достаточного объёма, закрыть ватно-марлевой пробкой и обернуть бумагой, закрепив веревкой. Стерилизовать в автоклаве при 1 атм., 121 °C, 30 мин.

2.1.2 Получение инокулята из музейной культуры

Музейная культура из банка хранится при пониженных температурах на скошенной агаризованной среде в колбе. Смывают с поверхности бактерии четырёх пробирок в стерильную 2 литровую колбу с одной ложкой полной среды Шлегеля.

Оптическая плотность инокулята после смыва из пробирок не менее 0,1 г/л (440 нм). При работе с инокулятом следует соблюдать правила асептики. Инокулят в колбе помещают в шейкер-инкубатор Innova 44 и инкубируют в течение 20–22 ч при 30 °C до получения оптической плотности не менее $0,2 \pm 0,02$ [29].

2.1.3 Получение инокулята в ферментёре-инокуляторе

После получения инокулята в шейкере его переносят в ферментёр-инокулятор Bioengineering NLF 22 объемом 30 литров, где культивируется до получения 10 л посевной культуры. Это минимальный объём необходимый для использования в ферментере объёмом 150 литров. Дальнейший процесс в ферментёре-инокуляторе длится 5 ч в режиме хемостата.

2.1.4 Двустадийная ферментация в производственном ферментёре.

После получения инокулята объём которого около 10-20 л он поступает в производственный ферментёр Bioengineering тип Р-сосуд объёмом 150 литров.

Когда процесс стерилизации ферментера и трансфера инокулята закончены, выставляют параметры, которые требуются для процесса ферментации. Главные из них температура $+ 30 \pm 0,5$ концентрация растворённого кислорода $dO\ 25 \pm 7\ \%$ (каскадное управление), обороты мешалки 100-700 оборотов в минуту (каскадное управление).

В процессе культивирования необходимо вручную контролировать концентрацию глюкозы и мочевины, и основные технологические параметры. При этом необходимо использовать строго перестатические насосы. Для предотвращения загрязнения и заражения культуры.

Процесс культивирования можно разделить на две стадии. Первая стадия характеризуется накоплением биомассы, процесс продолжается примерно 24 часа и достигает концентрации около 40–50 г/л. Также идет активное поглощение подпитывающих растворов солей азота и глюкозы. Второй этап можно охарактеризовать остановкой подачи подпитывающего раствора карбамида. В этот момент клетки начинают испытывать стресс и биомасса перестает расти, вместо этого увеличивается концентрация полимера в клетки запасяющего вещества. Продолжительность этого процесса составляет около 30 часов.

2.1.5 Концентрирование бактериальной культуры

Когда концентрация полимера в клетки достигает необходимого объёма, культуральную жидкость сливают в сборник, откуда она поступает в вакуум-выпарную установку «УВВ-50», где концентрируется до 300 – 350 г/л, затем перистальтическим насосом Ismatec Flowmaster FMT300 подается в сборник для упаренной суспензии.

2.1.6 Центрифугирование и лиофильная сушка сгущенной культуры

Из сборника упаренная суспензия попадает в центрифугу Avanti для дальнейшего концентрирования. После концентрации в центрифуге бактериальную биомассу, которая имеет вид сырой пасты с влажностью 50-60 %, необходимо разложить на подносах и лотках и лиофильно высушить в сублимационной установке IlshinBioBase произведенной в Корее.

Процесс лиофильной сушки начинается с заморозки биомассы до 40 °С и последующим нагреванием до +20 °С при давлении в камере 40 Па. Это происходит для того, что бы получить сухую биомассу. Эта биомасса используется для получения полимера и должна иметь влажностью не более 0,5 %. [5].

2.2 Природные наполнители

Наполнители (филлеры) добавляются для того, чтобы сделать композитные материалы на основе ПГА более дешёвыми в производстве и наделить их рядом полезных параметров, которыми можно по-разному варьировать. В эксперименте были использованы три природных материала:

- торф марки "Агробалт-Н (ЗАО Росторфинвест, Россия);

- Древесные опилки, полученные измельчением древесины березы на деревообрабатывающем станке МД 250-85 (компания «СтанкоПремьер», Россия);

- Глина (месторождение «Кузнецовское», Красноярский край, Россия)

Размол наполнителей производился ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 «Retsch», произведённой в Германии.

- Было использовано сито с диаметром отверстий 2 мм;

- Скорость вращения ротора 6000 об/мин.

Для определения фракционного состава порошка наполнителей использовалась аналитическая просеивающая машина AS 200 control Retsch, произведенная в Германии.

- Время фракционирования составляло около 10 минут, амплитуда выставлена на 1,5 мм, навеска 100 грамм.

2.3 Получение гранул из композитов.

Производство гранул начинается с измельчения полимера ударно-сдвиговым воздействием на ультрацентрибежной мельнице ZM 200 «Retsch» произведенной в Германии. Для предотвращения плавления полимера во время помола, измельчаемый материал и корпус с размольными элементами мельницы предварительно охлаждаются при - 80 °С около 20 мин в морозильной камере Innova U101 фирмы NEWBRUNSWICKSCIENTIFIC, произведенной в США. Размол проводится с использованием сита и диаметром отверстий 2 мм, скорость вращения ротора составляла 18000 об/мин.

Состав фракционирующего порошка полимера определяли, используя аналитическую машину для просеивания AS 200 Control Retsch, произведенную в Германии. Время фракционирования составляло около 10 мин. с амплитудой 1,5 мм и навеской 100 грамм.

Фракционный состав порошка полимера определяется с помощью аналитической просеивающей машины AS 200 control (Retsch, Германия). Время фракционирования 10 мин, амплитуда 1,5 мм, навеска 100 г.

Далее делается навеска полимера размером 2 грамма и растворяется в дихлорметане объемом 70 мл. Все ставится на лабораторные плитки с магнитными мешалками (HeidolphInstruments D-91126 Schwabach) при температуре 39 градусов до полного растворения на срок примерно около 60 минут.

После полного растворения без образования осадка и мелких кусочков, необходимо осадить полимер, добавив этанол объёмом 155 мл, и поставить в холодильник (Бирюса-151) на 90 минут до полного осаждения и образованного белого хлопьевидного осадка.

Далее к навескам измельченного полимера с размером частиц 200 мкм добавляются навески различных наполнителей с таким же размером частиц. Два порошка смешиваются в настольном планетарном миксере SpeedMixer DAC 250 SP (HauschildEng., Германия), время смешения 1 мин, скорость 1000 об/мин.

Смесь надлежит отфильтровать вакуумным насосом (MilliporeWP6122050) и добавить 2,8 грамма филлера имеющего размер частиц 200 мкм. Масса перемешивается до однородного состояния.

В эксперименте создавались гранулы из трех видов филлера и из чистого полимера для сравнения полученных результатов.

Последним шагом было заправить гомогенизированную смесь в шприц с последующим ровным выдавливаем на подносы. Сушка производится 24 часа.

Вслед за полным высыханием ПГА, его необходимо взвесить от 0,005 до 0,006 в 3 повторностях по три гранулы для 7 реперных точек. Соотношение наполнителя и ПГА соответствовало значениям 30% филлера и 70 % ПГА.

2.4 Исследование биodeградации гранул с различным наполнителем

Деградация гранул проводилась в лабораторных микрoэcosystemах с использованием контейнеров объемом 500 см³. В них насыпалась измельченная влажная земля 400 грамм. В которую закапывали на глубину 1,5 см заранее сшитые мешочки, в которые помещали три гранулы. Деградация проводилась при комнатной температуре 20 – 24 градуса. И влажности почвы около 50 %. При извлечении мешочка из земли, гранулы необходимо оттряхнуть, ополоснуть водой и высушить в течении 20 часов. Вес гранул измерялся на аналитических весах AGN 200, AXIS.

2.5 Изготовление долговременных формы гербицидных препаратов с опилками

Для получения долговременных форм гербицидных препаратов с опилками использовали специальный гранулятор Fimar итальянского производства. Соотношение композита в гранулах с горчицей было 50% П(ЗГБ), 30% опилок, 20% Трибнурол-метила. Для щитинника было другое соотношение 50% П(ЗГБ), 30% опилок, 10% метрибузина, 10% тибуканазола.

2.6 Экспериментальные формы препарата гербицидного действия в лабораторных посевах сорных растений

Для изучения воздействия на растения депонированных форм с гербицидом использовались коммерческие препараты с сорным растением горчица (*Sinapis arvensis*) трибенурон-метил, а с щетинником-лисий хвост (*Setaria macrocheata*) метрибузин. Выбор данных пестицидов был обусловлен предварительными исследованиями, которые показали их эффективность на сорняках и фитопатогенных грибах.

Гранулы с депонированными гербицидами и обработка коммерческим препаратом проводили одновременно с посевом семян. В отрицательном контроле обработку препаратом не проводили. В ходе эксперимента оценивали сроки начала и наступления массовой гибели растений, их плотность (количество на 1 м²), фотосинтетическую активность содержание пигментов

При подготовке эксперимента использовались контейнеры объемом 500 см³, в контейнеры помещалась земля массой 400 грамм и поддерживалась влажность на протяжении всего эксперимента около 50 %. После подготовки лабораторных микрэкосистем засеивались семена горчицей с культурным растением пшеница, а щитник – с ячменем. Посев семян производился в расчете 150 шт./м². После засева всех семян в положительном контроле их поливали разведённым раствором в соответствии с нормами установленными производителями. В контейнеры с депонированными формами закладывались гранулы. Для сравнения динамики был отрицательный контроль без гербицида.

Контейнеры помещались в климатическую камеру (Фитотрон-ЛиА-2 (Россия) при температуре 29 градусов. Длительность эксперимента составила 28 дней.

Для исследования экспериментального препарата и его действия на растения, происходила подготовка земли в контейнерах 500 см³, далее производился посев семян и закладка или поливка необходимым препаратом, Контейнеры помещали в климатическую камеру. Влажность поддерживалась на уровне 50% от массы, длительность эксперимента составила 28 дней

2.7 Регрессионный анализ

Статистическую обработку результатов проводили по стандартным методикам с использованием программного пакета анализа данных Microsoft Excel для Windows 8.1

Проводить оптимизацию процесса деградации полимерных гранул использовали математический метод планирования эксперимента по плану Бродского, данная методика позволяет определить и оценить влияние факторов при минимальном количестве проделанных экспериментов [31]. Показатели, которые оказывают существенное влияние на изучаемые объекты, имеют обозначение буквой X и имеют название факторы. Такой фактор может иметь несколько значений, эти значения называются уровни. Когда планировался эксперимент брались за основу воспроизводимые данные и объект, которым можно управлять.

Матрица планирования дробного эксперимента представлена в таблице 1. Основные факторы и уровни их вариации представлены в таблице 2.

Таблица 1. Матрица планирования дробного трехфазного эксперимента с двумя уровнями вариации фактора.

Надел и	Наполнитель
0	0
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
0	1
1	1
2	1
3	1
4	1
5	1

6	1
0	2
1	2
2	2
3	2
4	2
5	2
6	2
0	3
1	3
2	3
3	3
4	3
5	3
6	3

Таблица 2. Основные переменные факторы эксперимента и уровни их вариации для деградации

Уровни							
Факторы	0	1	2	3	4	5	6
Наполнитель	Чистый полимер	Торф	Опилк и	Глин а			
Недели	1	2	3	4	5	6	7

Параметры регрессии были описаны по множественной линейной методики и состоят из следующих шагов:

Уравнение множественной регрессии выглядело так:

$$Y = f(\beta, X) + \varepsilon, \quad (1)$$

где $X = (X_1, X_2, \dots, X_m)$ - вектор независимых переменных; β - вектор параметров (подлежащих определению); ε - случайная ошибка (отклонение); Y - зависимая (объясняемая) переменная.

Теоретическое линейное уравнение множественной регрессии может быть представлено в виде:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_m X_m + \varepsilon, \quad (2)$$

β_0 - свободный член, определяющий значение Y , в случае, когда все объясняющие переменные X_j равны 0.

После этого рассчитываются коэффициенты для принятой модели:

$$\beta_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i y_i. \quad (3)$$

Индекс множественной корреляции используется для определения тесноты совместного взаимодействия факторов (R). Его главное отличие от парного коэффициента корреляции в том, что он может иметь значения от 0 до 1. В связи с этим R не используется для определения направления связи. При более близком фактические построения значения y_i располагаются относительно линии регрессии, тем меньше остаточная дисперсия и, следовательно, больше величина $R_{y(x_1, \dots, x_m)}$. Это может означать что значения R могут быть приближены к единице, это позволяет уравнению регрессии более детально описывать данные эксперимента и влияние факторов. Но при значении фактора R близкого нулю уравнение не точно описывает полученные данные и влияние факторов.

$$R = \sqrt{1 - \frac{S_i^2}{\sum (y_i - y_{cp})^2}}; \quad (4)$$

Коэффициент множественной корреляции лучше обозначается через матрицу парных коэффициентов корреляции:

$$R = \sqrt{1 - \frac{\Delta_r}{\Delta_{r11}}}; \quad (5)$$

где Δ_r - определитель матрицы парных коэффициентов корреляции; Δ_{r11} - определитель матрицы межфакторной корреляции.

Квадрат при множественном коэффициенте корреляции является коэффициентом детерминации, который показывает долю вариации результативного признака, иллюстрирующей вариацию факторного признака. Проверяется однородность дисперсии по критерию Кохрена ($G_p < G_{табл}$):

$$G_p = \frac{S_{i\max}^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}; \quad (6)$$

Ошибка опытов:

$$S_y^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_i^2; \quad (7)$$

Производится расчёт дисперсии коэффициентов регрессии:

$$S_{ki}^2 = \frac{S_y^2}{N}; \quad (8)$$

Проверяется значимость коэффициентов регрессии: Рассчитывается коэффициент Стьюдента

$$t_{ip} = \frac{\beta_i}{S_{ki}^2}; \quad (9)$$

где β_i – коэффициент регрессии: Определяется табличный коэффициент Стьюдента t_{st} и проверить условие $t_{ip} < t_{st}$.

Проводится расчёт адекватности дисперсий:

$$S_{ad}^2 = \frac{m}{N-m} \sum_{i=1}^N (y_{cp} - y^x)^2 ; \quad (10)$$

где U_{cp} – среднее значение из всех повторений в каждой строке; y^x – значение, рассчитанное по уравнению регрессии.

Проводится расчет адекватности модели: рассчитывается критерий Фишера

$$F_p = S_{ad}^2 / S_y^2 ; \quad (11)$$

определяется табличный критерий $F_{таб}$ и осуществить их сравнение.

2.3 Объект исследования

Объектом исследования являются гранулы из П(ЗГБ) с природными наполнителями торф, глина, опилки, в объёме 30%.

3. Результаты

Выводы

Отработана методика изготовления и получены композитные формы в виде гранул на основе П(ЗГБ) с природными наполнителями (торф, глина, опилки) массой 0,005 - 0,006 грамм в соотношении полимер - филлер 70% на 30%.

Исследовано влияние природных наполнителей на скорость биodeградации полученных образцов гранул в лабораторных почвенных микрoэcosystemах. Получена математическая модель процесса биodeградации полученных образцов гранул. Уравнение $Y = 100,662 - 2,18998 \cdot X_1 - 1,04212 \cdot X_2$ дает представление о количественном влиянии каждого фактора на остаточную массу образцов в процессе деградации. .

Исследована гербицидная активность изготовленных форм препаратов на основе П(ЗГБ) и древесных опилок. Ингибирующий эффект экспериментальных форм, не уступал, а в некоторых опытах превосходил коммерческие препараты.

Список используемых источников

1. Oerke E.C. Crop losses to pests // J Agric Sci. – 2006. – Vol. 144. – Стр. 30-44.
2. Pimentel D/ Pesticides and pest controls // In: Peshin R., Dhawan A.K Integrated pest management: Innovation development process. Springer Science, 2009. – Стр. 80-90
3. Boatman N., Parry H., Bishop J., Cuthbertson A. // In: Hester R., Harrison R, Biodiversity under threat. RSG Publishing, 2007. Стр. 1-30.
4. Mineau P., Whiteside M. Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification // PLoS One. – 2013. – Том. 8. Стр. e57457
5. Hernandez A. F., Parron T., Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health // Toxicology. – 2013. – Том 37. – Стр 130 – 145.
6. Szekacs A. Forty years with glyphosate. In: Hasaneen MNAE- G Herbicides- properties, synthesis and control of weeds. Rijeka, Croatia, InTech., 2012. Стр. 240-285.
7. Согласно «Продовольственный кодекс» ООН за 1963 г. Терминологии принятой продовольственной и сельскохозяйственной ООН и в всемирной организацией здравоохранения.
8. Ippolito A., Modeling global distribution of agriculture insecticides in surface waters // Environ Pollut. – 2015. Том 198. – Стр. 53-62.
9. Popp J., Pesticide productivity and food security. Agron Sustain., Peto K., Nagy J // 2013. – Том 33. Стр. 240-255.
10. United States Environmental Protection Agency. Pesticide industry sales and usage. US Environmental Protection Agency, Washington, DC 2011, [http:// www.epa.gov/opp00001/pestsales/](http://www.epa.gov/opp00001/pestsales/).

11. Hernandez A.F. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. A.F. Hernandez, T. Parron, Tsatsakis A.M.// Toxicology. – 2013. – Tom 37. – Ctp. 135-145.
12. Weiss B., Pesticides. / B. Weiss., Amler S. Amler R.W.// Pediatrics. – 2004. Tom 113. – Ctp. 1025 – 1040.
13. MacDougall N. The economics of agricultural drainage. Report prepared for the Central Valley Regional Water Control Board. / N. MacDougall, W. M. Hanemann, D. Ziberman. // by the Department of Agricultural and Resource Economics, University of California, Berkeley, 1992
14. Benachour N., Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells// N. Benachour, GE Seralini, Chem Res Toxicol. – 2009. – Tom 22. Ctp. 95- 107.
15. Sanchez-Bayo F., Impact of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems/ F. Sanchez-Bayo, P.J. Mann // In: Ecological impact of toxic chemicals. Bentham Science Publishers Ltd., 2011. – Ctp. 60-90.
16. Siebers J. Investigation on downwind short-range transport of pesticides after application in agriculture crops / J. Siebers R. Binner // Chemosphere. – 2003 – Tom 51. Ctp. – Ctp. 395-410
17. Ribeiro M.L. Groundwater contamination by pesticides: preliminary evaluation / C. Lourencetti, M.L. Ribeiro // Quim Nova. – 2007. Tom 30. Ctp. 684- 700.
18. Soderlund D.M. The biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides/ D.M. Soderlund D.C. Knipple //Insect biochem Mol Biol. – 2003. – Tom 33. Ctp. 560 – 580.
19. Senor P.G. Polyhydroxybutyrate, a speciality polymer of microbial origin / P.G. Senor, A. Dean, D. Ellwood // Continuous culture. EllisHorwood, Chichester,UK. – 1984. – Tom 8. – Ctp. 265-270.
20. Hazer B., Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reaction for industrial and medical application // Appl. Microbion. Biotechnol. – 2007. Tom 74. Ctp. 1 – 14.


21. Волова Т.Г., Биоразрушаемые полимеры: синтез, свойства, применение. Монография. / Т.Г Волова, Е.И Шишацкая //Красноярский писатель: Красноярск. – 2011. – 390 стр.
22. Vololva T.G., Degradable Polymers: Production, Properties and Applications/ T.G. Vololva, E.I. Shishatskaya, A.J. Sinskey // Нью – Йорк «Nova Sci. Publ. Inc.» USA – 2013. – 382 стр.
23. Laycock B. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoate / B. Laycock, P. Halley, S. Pratt // Prog Polym Sci. – 2013. – Том 38. – Стр. 530 – 585.
24. Kessler B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism / B. Kessler, B. Witholt, // J. Biotechnol. – 2001. – Том. 86. – Стр. 95 – 105.
25. Volova, Microbial polyhydroxyalkanoates – plastic material of the 21st century (bio-ssynthesis, properties, applications) // Nova science pub. Inc. NY, USA. – 2004. – Стр. 289.
26. Abe H. Solid-state structure and enzymatic degradability for melt – crystalized films of copoly – mers of (R) - 3 – hydroxybbutyric acid with different hydroxyalkanoic acids // Macromol. – 1998. – Том 31. Стр. 1790 – 1800.
27. Gogowski S. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides PLA, poly(3-hydroxybbutyrate) and poly(3 – hydroxybbutyrate – co – 3 hydroxyvalerates), / S. Gogowski, M. Javanovic, S. Perren // J Biomed Mater Res. – 1993. – Том 27. Стр. 1130 – 1150.
28. Renard E. Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and factionalized polyhydroxyalkanoates // Polym Degrad Stab. – 2004. – Том 49. Стр. 780 – 790.

29. Miller N.D. On the biodegradation of poly – B – hydroxybutyrate homopolymer and poly – B – hydroxybutyrate - hydroxyvalerate colymers // Biomaterials. – 1987. – Том 8. – Стр. 130 – 137.
30. Madbouly S.A. Biodegradation behavior of bacterial – based polyhydroxyalkanoate and DDGS composites // Green Chem. – 2014. – Том 16. – Стр. 1910 – 1950.
31. Rehman R.A. Selection of potent bacterial strain for over – production of PHB by using low cost carbon source for eco – friendly bioplastics // Adv Life Sci. – 2015. – Том 3. – Стр. 28 – 36.
32. Mergaert J. In situ biodegradation of poly (3 - hydroxybutyrate – co – 3-hydroxyvalerate) in natural waters // Canad J Microbiol. – 1995. Том 41. Стр. 155 – 160.
33. Wang Y., Biodegradation studies of poly (3 - hydroxybutyrate – co – 3-hydroxyvalerate) / Y. Wang, W. Mo, Yao H, // Polym Degrad Stab. – 2004. – Том 85. Стр. 810 – 821.
34. Yew S.-P. Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyratefilms conaining titanium dioxide. / H. – Y. Tang, S.-P Yew, K. Sudesh, Том 91. Стр. 1800-1810.
35. Wang S. Estimation on biodegradability of poly (3 - hydroxybutyrate – co – 3- hydroxyvalerate) and numbers of aerobic PHBV degradion microorganisms in different natural environments / S. Wang, C. Song, W. Mizuno // J Polym Environ. – 2005. – Том 13. – Стр. 40 – 48.
36. Manna A., Degradation of microbial polyester poly (3 - hydroxybutyrate – co – 3- hydroxyvalerate) in environmental samples and in culture // Biodegradetion. – 2000. – Том 11. – Стр.320 – 330.
37. Шабает Ф.И. Особенности обработки почвы // Земледелие. – 2000. - №5. – Стр. 13.

38.Филин В.И Справочная книга по растениеводству с основами программирования урожая. – Волгоград, ВГСХА, 1994, Стр. 274.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии


УТВЕРЖДАЮ
/ Заведующий кафедрой
 Т. Г. Волова
« 26 » 06 2020 г.

Бакалаврская работа

Биодеградация и применение гранул на основе смесей из П(ЗГБ) и
природных материалов.

06.03.01 – Биология

Руководитель


подпись, дата

22.06.20
доцент, к. т. н.

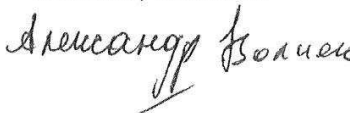
должность, учёная степень

С.В. Барановский

инициалы, фамилия

Выпускник

26.06.20
подпись, дата


Александр Волчек

А.И. Волчек
инициалы, фамилия

Красноярск 2020